

# 长白山野生膜荚黄芪 cDNA 文库的构建与初步鉴定

秦嘉泽, 全雪丽, 田海丽, 具红光, 吴松权

(延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002)

**摘要:**以长白山区野生膜荚黄芪根和叶为试材, 参照 TRIzol 说明书提取总 RNA, 采用 SMART 技术构建其全长 cDNA 文库, 为分子水平上揭示膜荚黄芪次生代谢调控机制提供充足的基因资源。结果表明:原始文库滴度为  $4.8 \times 10^5$  cfu/mL, 重组率接近 99.1%, 插入片段大于 0.5 kb, 平均大小 1.54 kb。所构建的 cDNA 文库的库容量、克隆效率和全长率满足挖掘膜荚黄芪次生代谢相关基因的要求。

**关键词:**长白山; 野生膜荚黄芪; cDNA 文库; 基因; 次生代谢

**中图分类号:**S 567.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)24-0084-04

黄芪为豆科黄芪属植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 或蒙古黄芪 *Astragalus membra-*

*naceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根, 是补气之常用中药, 具有补气固表、利尿排脓、敛疮生肌的功效<sup>[1]</sup>。由于长期大量采挖, 野生黄芪的数量急剧减少, 现已确定为国家三级保护植物。在吉林省长白山区黄芪以膜荚黄芪分布为主, 是吉林省长白山区道地药材之一, 也是长白山区重点保护的珍稀濒危野生药用植物之一<sup>[2]</sup>。不过由于各种原因导致长白山区储量不多的野生膜荚黄芪资源遭到了严重的破坏, 亟待保护。该研究以长白山区野生膜荚黄芪种质为材料构建

**第一作者简介:**秦嘉泽(1991-), 女, 吉林四平人, 硕士研究生, 研究方向为植物遗传育种。E-mail: qinjiazel23@sina.com.

**责任作者:**吴松权(1972-), 男, 黑龙江鸡西人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 现主要从事植物种质等研究工作。E-mail: arswsq@ybu.edu.cn.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30860036); 吉林省科技厅资助项目(201115228)。

**收稿日期:**2014-09-11

## Analysis of Landscape Plants of Zhuang Culture and Create a Unique Plant Landscape for Guilin Zizhou Park

KANG Xiu-qin<sup>1</sup>, WANG Jin-ye<sup>1</sup>, LUO Kai-wen<sup>2</sup>

(1. College of Tourism, Guilin University of Technology, Guilin, Guangxi 541004; 2. Guangxi Forest Inventory and Planning Institute, Nanning, Guangxi 530011)

**Abstract:** Based on the ethnobotany, the connotation of the Zhuang nationality of the garden plants and the special construction of plants landscape were studied in Zizhou Park, Guilin, Guangxi province. And the effects of the connotation of the Zhuang nationality of the garden plant were analyzed in the process of establishing a modern urban landscape features. The results showed that there were 105 plant species recorded in Zizhou Park during this plant resources investigation, and 74 plant species directly related to Zhuang nationality traditional used species. They were divided into four categories according to their usage, traditional medicinal plants, traditional edible plants, traditional calendar and folk beliefs plants, traditional daily production and life use plants. The mainly Zhuang nationality traditional used species were traditional medicinal and edible plants. Although the Zhuang nationality traditional used species were abundant in Zizhou Park, it is simple level, and lacks of characteristic landscape to highlight the connotation of the Zhuang nationality, and needs further promotion.

**Keywords:** Zhuang culture; ethnobotany; plant landscape; Zizhou park; Guilin

cDNA 文库、保存其基因资源,以期为分子水平上揭示膜荚黄芪次生代谢产物的合成途径及其调控机制提供充足的基因资源,特别是黄芪异黄酮和黄芪皂苷相关的基因资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为长白山野生膜荚黄芪,经延边大学农学院植物学教研室石铁源教授鉴定,凭证标本现存放在延边大学农学院植物学教研室。

总 RNA 提取试剂 TRIzol 购自 Invitrogen 公司;文库构建试剂盒 In-Fusion™ SMARTerc™ cDNA library Construction Kit 和 Advantage 2 PCR Kit 购自 Clontech 公司;大肠杆菌 DH5 $\alpha$  购自宝生物工程(大连)有限公司;其它试剂为国产或进口分析纯。

### 1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 提取 分别取 0.5 g 根和叶的新鲜组织,将其混合后,参照 TRIzol 说明书提取。1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 完整性, SMA 1000 超微量分光光度计(Merinton, USA)测定总 RNA 浓度。

1.2.2 cDNA 的合成 采用文库构建试剂盒中 Primer Extension 方法。在无菌的 PCR 管中加入 3.5  $\mu$ L (1  $\mu$ g) 总 RNA, 1.0  $\mu$ L 3' SMART CDS Primer II A (12  $\mu$ mol/L), 混匀, 瞬时离心, 72℃ 温育 3 min, 42℃ 温育 2 min。之后, 加入 2.0  $\mu$ L 5 $\times$  First-Strand Buffer, 0.25  $\mu$ L DTT (100 mmol/L), 1.0  $\mu$ L dNTP Mix (10 mmol/L), 1.0  $\mu$ L SMARTer II A Oligonucleotide (12  $\mu$ mol/L), 0.25  $\mu$ L RNase Inhibitor, 1.0  $\mu$ L SMARTScribe™ Reverse Transcriptase (100 U), 总体积为 10  $\mu$ L。混匀, 瞬时离心, 42℃ 温育 90 min, 冰上终止第 1 链 cDNA 的合成; 加入 1  $\mu$ L 25 mmol/L 的 NaOH, 混匀, 瞬时离心, 68℃ 温育 30 min, 冰上放置。在 11  $\mu$ L 第 1 链 cDNA 中加入 10  $\mu$ L 10 $\times$  Advantage 2 PCR Buffer, 2  $\mu$ L 50 $\times$  dNTP Mix (10 mmol/L), 2  $\mu$ L 5' PCR Primer II A (12  $\mu$ mol), 2  $\mu$ L 50 $\times$  Advantage 2 Polymerase Mix, 73  $\mu$ L 去离子水, 总体积为 100  $\mu$ L。混匀, 瞬时离心后进行 PCR, 反应程序为 72℃ 温育 10 min; 95℃ 变性 15 s, 65℃ 退火 30 s, 68℃ 延伸 6 min, 共 14 个循环合成双链 cDNA。取 5  $\mu$ L PCR 产物进行 1.2% 的琼脂糖电泳检测。

1.2.3 cDNA 文库构建 取 95  $\mu$ L 双链 cDNA 加到 CHROMA SPIN™ DEPC-1000 色谱柱, 700  $\times$  g 离心 5 min, 以去除 0.5 kb 以下片段, 收集管内液体。之后经无水乙醇沉淀, 70% 乙醇洗涤, 干燥后加 15  $\mu$ L TE 缓冲液重新溶解纯化后的 cDNA。取 5  $\mu$ L 纯化后的双链 cDNA 与

pSMART2IF 载体连接, 电击转化到 25  $\mu$ L 大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 电击参数为 1.8 kV, 脉冲时间为 5 ms。迅速置于冰中冷却, 加入 970  $\mu$ L 的 LB 培养基, 于 37℃ 下振荡 (225 r/min) 培养 1 h, 培养物即是原始文库。

1.2.4 文库滴度和重组率 取 10  $\mu$ L 转化后获得的文库, 加 1 mL LB 液体培养基, 涡旋混匀, 标记为稀释液 A (稀释系数  $10^{-2}$ )。吸取 10  $\mu$ L 稀释液 A 加 1 mL LB 液体培养基, 涡旋混匀, 标记为稀释液 B (稀释系数  $10^{-2}$ )。吸取 10  $\mu$ L 稀释液 A 加 40  $\mu$ L LB 液体培养基, 吸取 40  $\mu$ L 稀释液 B, 各自涂布在预热的 LB 平板上, 37℃ 倒置过夜培养。文库滴度 = 平板上单克隆数 / 涂板体积 (mL)  $\times$  稀释系数。重组率 = 白菌斑数 / (白菌斑数 + 蓝菌斑数)。

1.2.5 文库插入片段长度检测 随机挑取 15 个白斑菌落, 应用文库试剂盒的筛选引物, 进行 PCR 反应。反应程序: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 30 s, 65℃ 退火 30 s, 68℃ 延伸 3 min, 共 30 个循环。反应结束后, 取 10  $\mu$ L PCR 产物进行 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测插入片段的大小。

1.2.6 异黄酮合成酶基因的鉴定 以原始文库为模板, 利用异黄酮合成酶 (IFS) 上游特异引物: cctccaagtc-ctaaacctcg、下游特异引物: atctccatcgctctgctctc 进行 PCR。20  $\mu$ L 反应体系中模板 5  $\mu$ L, ExTaq (5 U) 0.2  $\mu$ L, dNTP (2.5 mmol/L) 2  $\mu$ L, 上下游引物 (2  $\mu$ mol/L) 各 2  $\mu$ L, ExTaq Buffer 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7.8  $\mu$ L。PCR 反应程序为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 56℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 30 个循环; 72℃ 温育 5 min。PCR 产物经凝胶电泳回收后与 pMD18-T 载体连接、转化大肠杆菌后挑选阳性克隆在英骏生物技术有限公司测序。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 提取

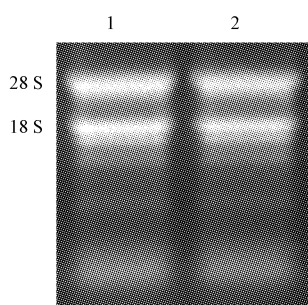
总 RNA OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值为 1.97, 表明获得的 RNA 纯度较高, 由图 1 可知, 28S rRNA 和 18S rRNA 条带清晰, 荧光比值接近 2 : 1, 说明总 RNA 没有降解, 其纯度和完整性均符合建立 cDNA 文库的要求。

### 2.2 cDNA 的合成

1  $\mu$ g 总 RNA 反转录合成第 1 条链后, Primer Extension 合成双链 cDNA, 5  $\mu$ L 反应产物经凝胶电泳结果如图 2 所示, 在 0.1~9.0 kb 之间呈弥散分布, 表明合成的双链 cDNA 完整, 在 1.7 kb 处出现了明亮的条带代表了长白山野生膜荚黄芪的组织特异性的 cDNA。

### 2.3 文库构建与质量评价

取稀释系数为  $5 \times 10^{-2}$  和  $10^{-4}$  的转化液各 50  $\mu$ L, 涂布在 LB 平板上, 通过统计菌落的个数即可计算文库



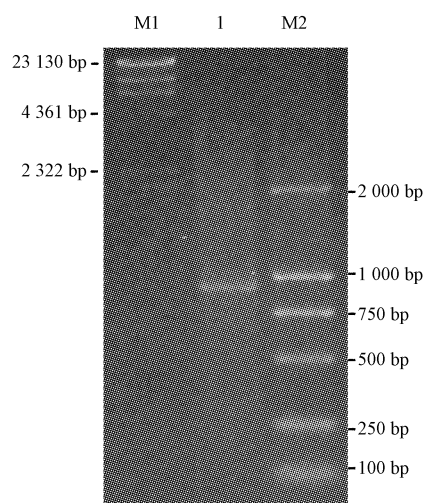
注:1,2-总 RNA。

Note:1,2-Total RNA.

图 1 总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳鉴定

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA

滴度,经检测,初始文库滴度为  $4.8 \times 10^5$  cfu/mL,重组率为 99.1%。随机挑取 15 个单克隆,进行菌落 PCR 扩增,估计文库插入片段大小。由图 3 可知,插入片段范围在 0.5~2.5 kb 之间,平均长度约 1.54 kb,1.0 kb 以上的片段有 13 个,占 86.7%,表明构建的文库满足全长 cDNA 文库构建要求。

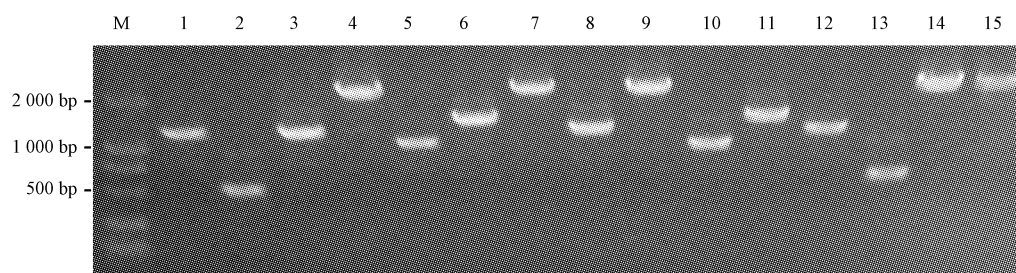


注:M1-Hind III Marker,M2-DL 2 000 Marker,1-双链 cDNA。

Note:M1-Hind III Marker,M2-DL 2 000 Marker,1-Double strand cDNA.

图 2 双链 cDNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of double strand cDNA



注:M-DL 2 000 Marker,1-15-单克隆。

Note:M-DL 2 000 Marker,1-15-Monoclone.

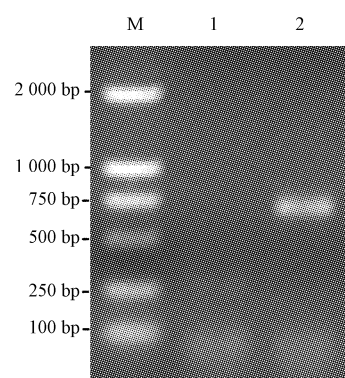
图 3 菌落 PCR 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of colony PCR

为了进一步验证文库的质量,以膜荚黄芪异黄酮合成的关键酶异黄酮合成酶(IFS)基因作为目的基因进行了菌液 PCR 鉴定(图 4 中泳道 2),得到了预期的 760 bp 左右的片段。克隆测序结果长度为 764 bp,与 NCBI 中登陆的膜荚黄芪 IFS 基因(JN882009)一致性为 99%,说明克隆的片段是膜荚黄芪 IFS 基因,进一步表明了构建的全长 cDNA 文库质量高。

### 3 讨论

近年来,构建全长 cDNA 文库已成为保存和发掘药用植物次生代谢相关基因资源的重要手段,在何首乌、甘草、冬虫夏草、水母雪莲和青蒿等中草药中得到了广泛应用<sup>[3]</sup>。目前,长白山区野生膜荚黄芪种质资源正在急剧减少,为了保存长白山野生膜荚黄芪所蕴含的次生



注:M-DL 2 000 Marker,1,2-菌液。

Note:M-DL 2 000 Marker,1,2-Broth.

图 4 IFS 基因 PCR 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of IFS gene



代谢相关的基因资源,该课题组开展了全长 cDNA 文库构建工作。

黄芪的次生代谢产物主要集中在根和叶,为保证提取的总 RNA 尽可能包含最多的次生代谢相关的基因资源,课题组分别提取了膜荚黄芪根和叶组织的总 RNA 后将其混合。采用 Clontech 公司的 In-Fusion™ SMARTer™ cDNA 文库构建试剂盒构建野生膜荚黄芪根的 cDNA 文库。该方法试验过程快速、简单,需要 RNA 量少,且建库效率高,直接用总 RNA 构建文库,可减少 mRNA 纯化过程中的降解和损失,使总 RNA 中的 mRNA 能最大限度地转化为 cDNA,从而有效地提高文库的完整性。在构建 cDNA 文库过程中,小片段 cDNA 会与载体优先连接,造成大片段信息的丢失,因此分级分离去除小于 0.5 kb 的 cDNA 片段很重要。双链 cDNA 经过 CHROMA SPIN-1000 柱分级分离后,使文库产生了大的插入片段,文库随机抽样 PCR 检测结果显示插入的片段都大于 0.5 kb,表明构建的 cDNA 文库质量高。

异黄酮是黄芪最主要的次生代谢产物和活性物质<sup>[4]</sup>,《中华人民共和国药典》2010 年版(1 部)已规定毛蕊异黄酮葡萄糖苷作为黄芪药材质量控制的指标之一<sup>[5]</sup>。IFS 是苯丙烷分支途径中由黄烷酮生物合成异黄酮的关键酶,主要分布在豆科植物中<sup>[4,6]</sup>。根据膜荚黄芪 IFS 基因的序列(JN882009)设计 1 对特异引物,对长

白山野生膜荚黄芪 cDNA 全长文库进行菌液 PCR 和克隆测序结果明确了 IFS 基因的正确表达,这很可能是因为黄芪根和叶组织都含有异黄酮类化合物合成的相关基因,推测 IFS 基因在根和叶中的表达相对较高,还有待进一步研究。此外,通过设计特异和简并引物该课题组筛选到了若干个与黄芪异黄酮和黄芪皂苷生物合成途径相关的基因,表明所构建的 cDNA 文库能够满足测序和 PCR 方法来发掘膜荚黄芪次生代谢相关基因的要求。

#### 参考文献

- [1] 吴松权,祖元刚,管清杰,等. 膜荚黄芪苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与序列分析[J]. 中草药,2010,41(3):456-460.
- [2] 赵玉兰,徐国经. 长白山珍稀濒危野生药用植物[J]. 吉林林业科技,2004,33(2):45-46.
- [3] 平军娇,张珍,蔡振锋,等. 千里光全长 cDNA 文库的构建及分析[J]. 中草药,2012,43(3):557-561.
- [4] Xu R Y, Nan P, Yang Y X, et al. Ultraviolet irradiation induces accumulation of isoflavonoids and transcription of genes of enzymes involved in the calycosin-7-O-β-D-glucoside pathway in *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao[J]. Physiol Plant, 2011, 142(3):265-273.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:283-284.
- [6] 陈宣钦,张乐,徐慧妮,等. 大豆异黄酮生物合成关键酶及其代谢工程研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2012,32(7):133-138.

## Construction and Primary Characterization of cDNA Library for Wild *Astragalus membranaceus* of Changbai Mountain

QIN Jia-ze, QUAN Xue-li, TIAN Hai-li, JU Hong-guang, WU Song-quan  
(Agricultural College, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002)

**Abstract:** Taking the roots and leaves of *A. membranaceus* of Changbai mountain as materials, total RNA was extracted reference the TRIzol instructions, and the full-length cDNA library was constructed by SMART technology, in order to provided adequate gene resources for revealing the regulatory mechanism of secondary metabolism of *Astragalus membranaceus* at the molecular level. The results showed that the titer of unamplified library was  $4.8 \times 10^5$  cfu/mL, the positive recombination rate was nearly 99.1%, the length of inserted fragments was larger than 0.5 kb, and the average length was 1.54 kb. The storage capacity, recombination rate and full-length efficiency of the constructed library could meet the requirements of screening genes for secondary metabolism in *A. membranaceus*.

**Keywords:** Changbai mountain; wild *Astragalus membranaceus*; cDNA library; gene; secondary metabolism